

Comparación de las frecuencias de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A entre pacientes con trombosis venosa profunda y población general mediterránea española

Francesc Francès¹, Olga Portolès^{1a}, Francisco Gabriel², Dolores Corella^{1b}, José Vicente Sorlí¹, Antonio Sabater¹, José L Alfonso^{1b}, Marisa Guillén¹.

Factor V Leiden (G1691A) and prothrombin-G20210A alleles among patients with deep venous thrombosis and in the general population from Spain

Background: Factor V Leiden and the -G20210A variant of prothrombin gene are associated to a higher risk of deep venous thrombosis. **Aim:** To assess the frequency of factor V Leiden (G1691A) and prothrombin -G20210A alleles in patients with deep venous thrombosis (DVT) and in the general population from Spain. **Material and methods:** Factor V Leiden (G1691A) and prothrombin-g20210a alleles were genotyped in 493 individuals from the Spanish general populations and in 131 patients with DVT. The presence of DVT was confirmed by phlebography. Allelic frequencies and the DVT risk associated with these variants were estimated. **Results:** Allelic frequencies for the factor V Leiden (G1691A) allele were 0.019 in patients with DVT and 0.010 in the general population ($p=0.235$). The frequencies for the prothrombin-G20210A allele were 0.027 and 0.026 ($p=0.975$). After adjustment for age and gender, the odds ratio for DVT, associated with the presence of G1691A allele was 2.41, but not statistically significant (95% confidence intervals 0.63-9.19). **Conclusions:** Prothrombin-G20210A allele was more prevalent than factor V Leiden (G1691A) allele in the Spanish population. However, the magnitude of the association between the G20210A and DVT risk is very low. On the contrary, the G1691A allele is associated by itself with a two fold increase in DVT risk in this population although without reaching statistical significance due to its low frequency (Rev Méd Chile 2006; 134: 13-20).

(Key words: Alleles; Factor V Leiden; G20210A; Prothrombin gene; Venous thrombosis)

Recibido el 25 de abril, 2005. Aceptado el 13 de julio, 2005.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS: 02/1096 y red G03/160) y por la Generalitat Valenciana (04/043).

¹Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departament de Medicina Preventiva. Universitat de València, España.

²Servicio de Medicina Interna, Hospital Clínico Universitario. València, España.

^aDoctora en Ciencias Biológicas.

^bDoctor en Farmacia.

Correpondencia a: Dr. Francesc Francès. Departamento de Medicina Preventiva, Universidad de València. Avda. Blasco Ibáñez, 15. 46010 València, Spain. Tfno: +34 963864417. Fax: +34963864166. E mail: francesc.frances@uv.es

La trombosis venosa profunda (TVP) es una entidad grave de compleja etiología y que representa un importante coste sanitario. Recientemente se han identificado una serie de variaciones genéticas en genes candidatos que podrían conferir mayor riesgo. El alelo G1691A, que se traduce en el cambio aminoacídico Q506A en el gen del factor V, también llamado factor V Leiden, y la variante G20210A en el gen de la protrombina, o factor II, se han asociado a un aumento del riesgo de TVP. Ambas mutaciones parecen haber tenido un origen único en Oriente Medio hace entre 21.000 y 34.000 años^{1,2}. Se considera que estas mutaciones se extendieron hacia la India y Europa durante la expansión neolítica. Estudios realizados en poblaciones del norte de Europa han descrito que la presencia del alelo G1691A en homocigosis aumenta el riesgo de trombosis entre 50 y 100 veces, mientras que en heterocigosis lo aumentaría de 5-10 veces^{3,4}. Por otra parte para el alelo G20210A en el gen de la protrombina, algunos estudios han estimado que su presencia aumentaría 3 veces el riesgo de TVP⁵, siendo esta asociación controvertida en otros estudios^{6,7}. En el momento actual existen escasos estudios que investiguen la prevalencia de estos dos alelos en la población general española y latinoamericana. Además, algunos trabajos sugieren que el principal factor de riesgo genético de TVP en población española sería el alelo G20210A de la protrombina, predominando ésta sobre el factor V Leiden^{8,9}. Por el contrario, esta última variante se ha descrito como más prevalente en el norte de Europa¹⁰. En el caso de Argentina y Chile, la prevalencia de ambas variantes parece ser similar⁷ y, al igual que en población española, no existen suficientes estudios sobre el impacto de dichos alelos en el riesgo de TVP.

Por ello, los objetivos de este estudio son: 1) Estimar la frecuencia de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A en población general procedente del Levante español. 2) Comparar esta frecuencia alélica con las frecuencias obtenidas en otras regiones españolas y otros países europeos y latinoamericanos. 3) Estimar la frecuencia de cada una de las variaciones en una segunda muestra de pacientes afectados de TVP procedentes de la misma zona geográfica, con el fin de comparar su frecuencia y estimar el riesgo de TVP asociado a cada una de ellas.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos. Se estudiaron dos muestras de individuos procedentes de población mediterránea española. La primera muestra estaba compuesta por 493 sujetos (227 varones y 266 mujeres) adultos residentes en la provincia de Valencia. Estos individuos fueron seleccionados entre los pacientes y acompañantes que acudieron a una consulta de salud en su centro de Atención Primaria durante el período comprendido entre febrero de 2000 y mayo de 2001¹¹. Se excluyeron de este estudio a los no nacidos en territorio español. Ninguno de estos participantes había sufrido TVP. La segunda muestra de participantes estaba compuesta por 131 pacientes (71 hombres y 60 mujeres) con diagnóstico de TVP confirmado mediante flebografía con los criterios que se detallan en un trabajo previo¹². Estos pacientes fueron reclutados consecutivamente en el Hospital Clínico Universitario de València durante el período comprendido entre febrero de 2000 y diciembre de 2002 y tuvieron una media de edad de 66 años. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de València y por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de València. El estudio se realizó cumpliendo las normas éticas exigidas internacionalmente y se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes.

Aislamiento de ADN e identificación del alelo Leiden en el loci factor V y del alelo G20210A en el gen de la protrombina. El ADN de cada individuo se obtuvo a partir de leucocitos aislados de sangre periférica, utilizando un protocolo estándar basado en la extracción con fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol¹³. El ADN genómico se amplificó mediante PCR utilizando los pares de cebadores que se muestran en la Tabla 1. La mezcla final de reacción (volumen final 25 µl) contenía: 1 ng ADN, 0,1 µM de cada cebador, 2 mM de MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (PH=9) y 0,5 unidades de Taq polimerasa. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 95° durante 5 minutos, hibridación durante 60°C durante 30 segundos seguido de elongación a 72°C durante 40 segundos, realizados en 35 ciclos, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. El análisis de las dos mutaciones se realizó mediante una técnica multiplex alelo específica¹⁴. Los productos

Tabla 1. Cebadores utilizados para el análisis de los loci FV y FII en pacientes con trombosis venosa profunda y población general

Cebador	Secuencia
ProFC*	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGCAGA-3'
ProRC*	5'-CTCCAAACTGATCAATGACCTTC-3'
ProM*	5'-CACTGGGAGCATTGAGGCAT-3'
ProN*	5'-CACTGGGAGCATTGAGGCAC-3'
FVC*	5'-GGGGGACAATTTTCAATATATTTTCTTTTCAGGCAG-3'
FVN*	5'-GGGGGTTCAAGGACAAATACCTGTATTCCAC-3'
FVM*	5'-GGGGGTTCAAGGACAAATACCTGTATTCCAT-3'

*ProFC: *Prothrombin Forward Consensus*, ProRC: *Prothrombin Reverse Consensus*, ProM: *Prothrombin Reverse Mutant*, ProN: *Prothrombin Reverse Normal*, FVC: *Factor V Forward Consensus*, FVN: *Factor V Normal*, FVM: *Factor V Mutant*.

de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en agarosa MS8 al 3% y posterior visualización con luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio. Los resultados de cada electroforesis fueron interpretados por dos investigadores, repitiendo en caso de discrepancia si la hubiese. Por otro lado, el control de calidad del genotipado se mantuvo en cada momento incluyendo también un control positivo y otro negativo.

Estadística. Se calcularon las frecuencias genotípicas mediante conteo, y a partir de ellas se calcularon las frecuencias alélicas. Se aplicó el test de Ji Cuadrado para verificar el equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en la población general como en los pacientes afectados de TVP. Se agruparon los portadores homocigotos y heterocigotos para los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A, se compararon sus frecuencias en ambas poblaciones mediante el test de Ji cuadrado. Para estudiar el riesgo asociado a la presencia de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A, se utilizaron modelos de regresión logística. Mediante estos modelos se estimó la odds ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC) al 95%. Se realizó primero un modelo crudo y después, dado que ambas muestras no estaban apareadas por edad y sexo, se elaboró un nuevo modelo multivariante ajustado por edad y sexo.

RESULTADOS

Todos los individuos pertenecientes a la población general (n=498) y todos los pacientes afectados de TVP

(n=131) fueron objeto de estudio genotípico para investigar la presencia del alelo factor V Leiden (G1991A) y el alelo protrombina-G20210A. En la Tabla 2 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de los loci factor V y protrombina en ambas poblaciones. En el caso de la variante G20210A, las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio genético de Hardy-Weinberg en ambas poblaciones ($p=0,548$ para la población general y $p=0,753$ en casos de TVP). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos entre la población general y los casos de TVP ($p=0,975$). La frecuencia de heterocigotos para la variante alélica protrombina-G20210A fue igual en ambas poblaciones (5,3%), siendo sus frecuencias alélicas de 0,026; IC al 95%: 0,023-0,03 y 0,027; IC al 95%: 0,019-0,037 en los casos y en población general, respectivamente.

En el caso del factor V Leiden, la distribución de frecuencias también se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,820$ en población general y 0,824 en casos de TVP). La frecuencia de los heterocigotos para la variante G1691A fue 2,03% para población general y de 3,82% para casos de TVP. Como se puede observar en la Tabla 2, la frecuencia alélica obtenida para el factor V Leiden es mayor en pacientes de TVP que en población general (0,019; IC al 95%: 0,013-0,028 vs 0,010; IC al 95%: 0,008-0,013, respectivamente), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,235$).

Para estimar la asociación entre las variantes genéticas del factor V Leiden y de la protrombina con el riesgo de TVP, se aplicó un análisis de regresión logística simple, calculando la OR de

exposición de los casos en comparación con la de los controles. En la Tabla 3 se observa que ni los portadores del factor V Leiden (G1961A) ni los portadores de alelo protrombina-G 20210A presentaron un aumento significativo de riesgo de padecer TVP ($OR_{cruda}=1,90$; IC al 95%: 0,64-5,71 para FVL y $OR_{cruda}=1,01$; IC al 95%: 0,43-2,39 para la variante protrombina-G20210A). Cuando estos valores se ajustaron considerando la edad y el sexo, ambas variantes genéticas permanecieron sin asociarse significativamente con el riesgo de TVP.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos estimado la frecuencia alélica de las variantes factor V Leiden y protrombina-G20210A en una muestra aleatoria de población general española y en una muestra de pacientes afectados de TVP.

En el caso de la variante protrombina-G20210A, hemos encontrado una frecuencia alélica de 0,026 en población general. Otros estudios realizados en la península ibérica estimaron frecuencias cercanas

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas para los loci FV y FII en población general y en los casos de trombosis venosa profunda

	Población General (n=493) n (%)	Casos TVP (n=131) n (%)
Variante genética protrombina-G20210A		
Genotipo		
GG	467 (94,7)	124 (94,6)
GA	26 (5,3)	7 (5,3)
AA	0 (0)	0 (0)
Frecuencia alélica G20210A	0,026	0,027
IC al 95%	(0,023-0,031)	(0,019-0,037)
Variante genética factor V Leiden (G1691A)		
Genotipo		
GG	483 (98)	126 (96,2)
GA	10 (2)	5 (3,8)
AA	0 (0)	0 (0)
Frecuencia alélica G1691A	0,010	0,019
IC al 95%	(0,008-0,013)	(0,013-0,028)

IC: Intervalo de confianza.

Tabla 3. Asociación entre las variantes genéticas factor V Leiden (G16191A) y protrombina-G20210A con el riesgo de trombosis venosa profunda. Análisis de regresión logística, simple y múltiple

	Regresión logística simple			Regresión logística múltiple*		
	B _{crudo}	OR (IC 95%)	p	B _{ajustado}	OR (IC 95%)	p
Factor V Leiden	0,651	1,92 (0,64-5,71)	0,243	0,878	2,41 (0,63-9,19)	0,199
Protrombina G20210A	0,014	1,01 (0,43-2,39)	0,975	-0,483	0,62 (0,22-1,70)	0,351

B: Coeficiente de regresión. OR: *Odds Ratio*. IC: Intervalo de Confianza. *: Coeficientes ajustados por el efecto de la edad y sexo.

a nuestro valor; 0,025 en Oporto¹⁵ o ligeramente inferiores; 0,018 en Oviedo¹⁶. La frecuencia de esta variante en la provincia de València únicamente es superada por la frecuencia encontrada en Barcelona, donde se estimó un valor de 0,032⁷. Cuando analizamos la distribución en las distintas poblaciones del continente europeo del alelo protrombina-G 20210A, observamos la existencia de un eje mediterráneo de mayor frecuencia de este polimorfismo. Así, cabe citar las frecuencias alélicas estimadas de 0,022 en Italia¹⁷, 0,040 en Chipre¹⁸ y 0,038 en Grecia¹⁹, frente al área centro y norte europea, donde se obtienen valores de 0,009 en Irlanda²⁰ y 0,007 en Suecia²¹. Esta distribución de frecuencias en la población española ha influido en las frecuencias de población americana, tal como se muestra en la Tabla 4.

Respecto a la distribución de alelo factor V Leiden (G1691A), la frecuencia alélica obtenida en nuestro estudio (0,011), se muestra armónica con las cifras obtenidas en la península ibérica y sur de Francia, donde se han obtenido frecuencias de 0,017 en Perpignan²², 0,017 en Oviedo²³ y 0,005 en Madrid²⁴. En Europa, las mayores frecuencias se observan en el área centroeuropea como demuestran las frecuencias de 0,036 en Alemania²⁵ y 0,057 en Hungría²⁶, mientras que en el área mediterránea encontramos frecuencias alélicas significativamente inferiores, tales como 0,009 en Italia²⁷ y 0,005 en Portugal²⁸. Como se aprecia en la Tabla 4, las frecuencias latinoamericanas son compatibles con

los flujos migratorios procedentes de la Europa meridional que se dieron a partir de finales del s. XV.

Nos encontramos pues, ante dos patrones diferentes de distribución geográfica en el continente europeo para las dos variantes estudiadas, con un probable origen geográfico común en el Próximo Oriente, ya que las frecuencias alélicas son igualmente altas en Medio Este²⁹ y Chipre¹⁹. Clásicamente, se han explicado estas diferencias genéticas en la distribución europea de ambas variantes a través de diferencias geográficas en factores de riesgo ambientales y fenómenos de selección asociados a interacciones gen-ambiente. Más recientemente, se ha sugerido como responsable de esta distribución al efecto fundacional¹.

Estudios de haplogrupos sugieren una primera oleada migracional limitada a la cuenca mediterránea debido a la era glacial durante el paleolítico superior temprano y una segunda oleada migracional con destino a centroeuropa durante el neolítico³⁰. La distribución de los alelos de ambos *loci* sigue patrones diferentes, coincidentes con las dos distintas migraciones sugeridas por los haplogrupos. Cabe, pues, pensar que el alelo protrombina-G20210A fuera introducido durante el paleolítico, mientras que el alelo factor V Leiden lo fuera durante el neolítico. Esta diacronicidad explicaría el caso vasco. Este pueblo estuvo aislado en época neolítica, junto a los inuit (Groenlandia)³¹. Esto justificaría la baja frecuencia del alelo factor V Leiden en vascos. Ahora bien, la

Tabla 4. Frecuencia de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A en diferentes países sudamericanos

	País	n	Autor	Frecuencia Alélica
Protrombina-G20210A	Argentina	418	Genoud et al (43)	0,013
	Argentina	200	Adamczuk et al (44)	0,010
	Brasil	144	Rosendaal et al (45)	0,007
	Brasil	295	Arruda et al (46)	0,007
Factor V Leiden	Argentina	215	Herrmann et al (47)	0,026
	Argentina	418	Genoud et al (48)	0,015
	Argentina	498	Hepner et al (49)	0,008
	Argentina	200	Adamczuk et al (44)	0,015
	Chile	159	Pereira et al (49)	0,019
	Colombia	150	Camacho et al (50)	0
	Venezuela	126	Herrmann et al (47)	0,008
	Brasil	295	Arruda et al (46)	0,010

elevada frecuencia del alelo protrombina-G20210A^{32,33} contradecía esta hipótesis. No obstante, si se considera la presencia del alelo protrombina-G20210A como parte del sustrato preneolítico, esta aparente paradoja desaparece.

Por otro lado, las frecuencias observadas en amerindios confirman la ausencia de estos alelos en dicha población³⁴⁻³⁶. La introducción de estos alelos en el continente americano tuvo lugar tras la llegada de los europeos a estas tierras. Chile recibió aportes hispanos y posteriormente itálicos y germánicos entre otros, lo cual explicaría las frecuencias encontradas en esta región.

En nuestro estudio también se ha estimado la asociación entre las variantes genéticas factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A con el riesgo de TVP. Existen diversos estudios de casos y controles que evalúan el riesgo de TVP asociado a la presencia del alelo protrombina-G20210A. Souto et al⁷ y Margaglione et al³⁷ estimaron que la presencia de este alelo incrementaba alrededor de 3 veces el riesgo de TVP (OR=3,1, IC del 95%: 1,4-6,6 y OR=3,88, IC del 95%: 2,23-6,74, respectivamente). No obstante, otros estudios, no logran evidenciar un claro aumento de riesgo asociado a este alelo^{8,9,15,38}. Alvarez et al²⁴ encontraron mayor frecuencia alélica de la variante 20210A en el FII en población general que en casos. En nuestro estudio, el riesgo de TVP asociado a la variante protrombina-G20210A no alcanzó la significación estadística (OR_{cruda}=1,01; IC al 95%: 0,43-2,39; p=0,975, OR_{ajustada}=0,62; IC al 95%: 0,22-1,70; p=0,98). Una probable explicación de este fenómeno sería que ésta no confiere un exceso de riesgo trombótico *per se* al portador o bien el papel

de este alelo sería muy tangencial en la génesis de la trombosis, siendo necesaria la concurrencia de otros factores de riesgo genéticos o ambientales adicionales. Esta apreciación ha sido realizada también en diversos estudios realizados por Girolami y cols^{6,39} en los que se comunican repetidamente casos de individuos homocigotos para dicho alelo, que no presentan clínica trombótica, incluso concurriendo otros factores de riesgo trombótico como los anticonceptivos hormonales orales.

Respecto al factor V Leiden, la mayoría de estudios coinciden en señalarlo como un factor de riesgo confirmado de TVP^{9,19}. Si bien nuestros datos no alcanzan significación estadística (OR= 2,41; IC del 95%: 0,63-9,19; p=0,199), sí que encontramos un mayor riesgo de TVP asociado a dicho alelo. El motivo probable de esta ausencia de significación sea el limitado poder estadístico, dada la escasa prevalencia del alelo Leiden en nuestro medio.

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que a pesar de la mayor prevalencia de la variante protrombina-G20210A en población mediterránea, su asociación con un mayor riesgo de TVP es mucho menor que la asociación del factor V Leiden, el cual posee menor prevalencia. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios con mayor tamaño de muestra, diseñados para evaluar las posibles interacciones genético-ambientales en el riesgo de TVP⁴⁰⁻⁴². Además, dada la escasez de estudios específicos, se requieren nuevos trabajos que ayuden a definir mejor la distribución de los alelos estudiados en el continente sudamericano y valorar su impacto sobre la patología trombótica venosa en estas poblaciones.

REFERENCIAS

- ZIVELIN A, GRIFFIN JH, XU X, PABINGER I, SAMAMA M, CONARD J ET AL. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997; 89: 397-402.
- REES DC, CHAPMAN NH, WEBSTER MT, GUERREIRO JF, ROCHETTE J, CLEGG JB. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol* 1999; 105: 564-6.
- GARDNER J. Factor V Leiden with deep venous thrombosis. *Clin Lab Sci* 2003; 16: 6-9.
- ROSENDAAL FR, KOSTER T, VANDENBROUCKE JP, REITSMA PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
- POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
- GIROLAMI A, SIMIONI P, SCARANO L, CARRARO G. Prothrombin and the prothrombin 20210 G to A polymorphism: their relationship with hypercoagulability and thrombosis. *Blood Rev* 1999; 13: 205-10.
- BONDUEL M, HEPNER M, SCIUCCATI G, PIERONI G, FELIUTORRES A, MARDARAZ C ET AL. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation in children with venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2002; 87: 972-7.

8. SOUTO JC, COLL I, LLOBET D, DEL RIO E, OLIVER A, MATEO J ET AL. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-9.
9. AZNAR J, VAYA A, ESTELLES A, MIRA Y, SEGUI R, VILLA P ET AL. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica* 2000; 85: 1271-6.
10. LUCOTTE G, MERCIER G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 362-7.
11. SORLI JV, VELERT R, GUILLEN M, PORTOLES O, RAMÍREZ JB, IBORRA J ET AL. Efecto del polimorfismo de la Apolipoproteína E en el perfil lipoproteico y riesgo cardiovascular en una población mediterránea. *Med Clin* 2002; 118: 569-74.
12. GABRIEL F, LABIOS M, PORTOLES O, GUILLEN M, CORELLA D, FRANCES F ET AL. Incidence of post-thrombotic syndrome and its association with various risk factors in a cohort of Spanish patients after one year of follow-up following acute deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004; 92: 328-36.
13. SAMBROOK J, FROTSCH EF, MANIATIS T. In: Ford N, Nolan C, Ferguson M, editors. *Molecular cloning*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
14. HESSNER MJ, LUHM RA, PEARSON SL, ENDEAN DJ, FRIEDMAN KD, MONTGOMERY RR. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost* 1999; 81: 733-8.
15. MANSILHA A, ARAUJO F, SAMPAIO S, CUNHA RIBEIRO LM, BRAGA A. The PORtomb Project: prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in young people. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 45-8.
16. VARGAS M, SOTO I, PINTO CR, URGELLES MF, BATALLA A, RODRIGUEZ-REGUERO J ET AL. The prothrombin 20210A allele and the factor V Leiden are associated with venous thrombosis but not with early coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 39-41.
17. MARGAGLIONE M, BRANCACCIO V, DE LUCIA D, MARTINELLI I, CIAMPA A, GRANDONE E ET AL. Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest* 2000; 118: 1405-11.
18. AKAR N, MISIRLIOGLU M, AKAR E, AVCU F, YALCIN A, SOZUOZ A. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. *Am J Hematol* 1998; 58: 249.
19. ANGELOPOULOU K, NICOLAIDES A, CONSTANTINOU DELTAS C. Prevalence of genetic mutations that predispose to thrombophilia in a Greek Cypriot population. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6: 104-7.
20. KEENAN C, LIVINGSTONE WJ, WHITE B, MYNETT-JOHNSON L, CUSACK S, LAWLER M ET AL. Prevalence of the prothrombin G20210A mutation in the Irish populations: use of a novel polymerase chain reaction approach. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11: 669-72.
21. LINDMARKER P, SCHULMAN S, STEN-LINDER M, WIMAN B, EGBERG N, JOHNSON H. The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. DURAC Trial Study Group. Duration of Anticoagulation. *Thromb Haemost* 1999; 81: 684-9.
22. LUCOTTE G, MERCIER G. Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in France. *Br J Haematol* 1997; 99: 237-41.
23. GARCIA-GALA JM, ALVAREZ V, PINTO CR, SOTO I, URGELLES MF, MENÉNDEZ MJ ET AL. Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. *Clin Genet* 1997; 52: 206-10.
24. ALVAREZ A, BARROSO A, ROBLEDO M, ARRANZ E, OUTEIRINO J, BENÍTEZ J. Prevalence of factor V Leiden and the G20210A mutation of the prothrombin gene in a random group of patients with thrombotic episodes. *Sangre* 1999; 44: 7-12.
25. SCHRODER W, KOESLING M, WULFF K, WEHNERT M, HERRMANN FH. Large-scale screening for factor V Leiden mutation in a north-eastern German population. *Haemostasis* 1996; 26: 233-6.
26. TORDAI A, KLEIN I, RAJCSY K, PÉNZES M, SARKADI B. Prevalence of factor V Leiden (Arg506Gln) in Hungary. *Br J Haematol* 1997; 99: 466-7.
27. DE STEFANO V, VOSO MT, CHIUSOLO P, PACIARONI K, BIZZI B, LEONE G. Prevalence of mutated factor V ARG506 to GLN in Italians. *Thromb Haemost* 1997; 77: 216-7.
28. FERRER-ANTUNES C, PALMEIRO A, GREEN F, ROSA H, FELICIANO B, SILVA E. Polymorphisms of fibrinogen, factor VII and factor V genes: Comparison of allele frequencies in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1379.

29. SELIGSOHN U, ZIVELIN A. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost* 1997; 78: 297-301.
30. RICHARDS MB, MACAULAY VA, BANDELT HJ, SYKES BC. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 241-60.
31. DE MAAT MP, BLADBJERG EM, JOHANSEN LG, GRAM J, JESPERSEN J. Absence of prothrombin mutation in Inuit (Greenland Eskimos) *Thromb Haemost* 1998; 79: 882.
32. ZABALEGUI N, MONTES R, ORBE J, AYAPE ML, MEDARDE A, PARAMO JA ET AL. Prevalence of FVR506Q and prothrombin 20210A mutations in the Navarrese population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 522-3.
33. BAUDUER F, DUCOUT L, FREYBURGER G. Assessment of the 20210 G to A prothrombin variant in a sample of patients from the French Basque Country with various thrombophilic conditions. *Ann Hematol* 2003; 82: 353-6.
34. REES DC, COX M, CLEGG JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.
35. ARRUDA VR, VON ZUBEN PM, SOARES MCP, MENEZES R, ANNICHINO-BIZZACCHI JM AND COSTA FF. Very low incidence of Arg506->Gln mutation in the factor V gene among the Amazonian Indians and the Brazilian Black population. *Thromb Haemostasis* 1996; 75: 859-63.
36. GREGG JP, YAMANE AJ, GRODY WW. Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am J Med Genet* 1997; 19; 73: 334-6.
37. MARGAGLIONE M, BRANCACCIO V, GIULIANI N, D'ANDREA G, CAPPUCCI G, IANACCONE L ET AL. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G—>A20210 gene variant. *Ann Intern Med* 1998; 129: 89-93.
38. TOSETTO A, MISSIAGLIA E, FREZZATO M, RODEGHIERO F. The VITA project: prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in the general population. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1395-8.
39. GIROLAMI A, SIMIONI P, MANFRIN D, TORMENE D, LUNI S. Asymptomatic homozygous nt 20210 G to A prothrombin polymorphism in two blood donors belonging to two different kindreds. *Clin Appl Thromb Hemost* 1999; 5: 48-51.
40. KHOURY MJ, YANG Q. The future of genetic studies of complex human diseases: an epidemiologic perspective. *Epidemiology* 1998; 9: 350-4.
41. KHOURY MJ. Genetic epidemiology and the future of disease prevention and public health. *Epidemiol Rev* 1997; 19: 175-80.
42. KOHURY MJ. Relationship between medical genetics and public health: changing the paradigm of disease prevention and the definition of a genetic disease. *Am J Med Genet* 1997; 71: 289-91.
43. GENOUD V, CASTAÑON M, ANNICHINO-BIZZACCHI J, KORIN J, KORDICH L. Prevalence of three prothrombotic polymorphisms: factor V G1691A, Factor II G290210A and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in Argentina. *Thromb Res* 2000; 1; 100: 127-31.
44. ADAMCZUK Y, IGLESIAS VARELA ML, FORASTIERO R, MARTINUZZO M, CERRATO G, POMBO G ET AL. Factor V Leiden and prothrombin G20210A variant are risk factors for venous thromboembolism in the Argentinean population. *Thromb Haemost* 2000; 83: 509-10.
45. ROSENDAAL FR, DOGGEN CJ, ZIVELIN A, ARRUDA VR, AIACH M, SISCOVICK DS ET AL. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79: 706-8.
46. ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, GONCALVES MS, COSTA FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1430-3.
47. HERRMANN FH, KOESLING M, SCHRODER W, ALTMAN R, JIMÉNEZ BONILLA R, LOPACIUK S ET AL. Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997; 14: 403-11.
48. HEPNER M, ROLDÁN A, PIERONI G, FRONTROTH JP, SERVIDDIO RM, TORRES AF ET AL. Factor V Leiden mutation in the Argentinian population. *Thromb Haemost* 1999; 81: 989.
49. PEREIRA J, QUIROGA T, GOYCOOLEA M, MUÑOZ B, HIDALGO P, KALTWASSER G ET AL. Resistencia a la proteína C activada: estudio de laboratorio y prevalencia del defecto en la población chilena. *Rev Méd Chile* 1996; 124: 663-8.
50. CAMACHO VANEGAS O, GIUSTI B, RESTREPO FERNANDEZ CM, ABBATE R, PEPE G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb Haemost* 1998; 79: 883-4.

Agradecimientos

Francesc Francès es becario de la Universitat de València (Beca «V Segles»).